

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari sampai Agustus 2018. Lokasi pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Riset, Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia; LPPT Universitas Gajah Mada; Laboratorium Kimia Analitik Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengentahuan Alam ITB.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, satu set *rotary evaporator vacuum*, pompa vakum, neraca analitik, corong *Buchner*, *freeze dryer*, *stirrer*, *magnetic stirrer*, spatula, kaca arloji, corong kaca, pipet tetes, *sentrifuge*, *tube* 15 ml, corong pisah 100 ml, *shaker*, pH meter dan batang pengaduk yang digunakan pada tahapan ekstraksi dan sintesis. Sedangkan pada tahapan karakterisasi digunakan berbagai alat instrument seperti spektrometer FTIR Shimadzu 8400 dan pada tahap uji katalepsi, peralatan yang digunakan yaitu sonde, suntikan 1 mL, labu takar 10 mL, lumpang alu, gelas kimia 50 mL, gelas kimia 100 mL, batang pengaduk, spatula, kandang dan besi berdiameter 0,5 cm

3.2.2 Bahan

Pada penelitian ini bahan-bahan yang digunakan adalah biji karabenguk (*Mucuna pruriens* Linn) yang diperoleh dari Bantul, Yogyakarta. Bahan kimia yang digunakan pada ekstraksi biji karabenguk dan sintesis biokomposit Gelatin-Glutaraldehid *Mucuna pruriens* L (G-GMP) adalah akuades, etanol 96% teknis,

asam sitrat p.a, Gelatin tipe B, aqua demineralisasi, glutaraldehid 25%, aseton p.a, tween-80, asam klorida 0.1 M dan kertas saring.

Pada tahap uji katalepsi digunakan bahan-bahan seperti hewan uji mencit jantan berusia tiga bulan dengan berat badan 22-36 gram sebanyak 30 ekor, pakan mencit CP 511, Halopeidol, PGA (*Poly Glutamic Acid*), L-DOPA standar, ekstrak *Mucuna pruriens L*, dan 5 dosis G-GMP.

3.3 Metode Penelitian

Pada penelitian ini dilaksanakan dalam 5 tahapan yaitu (1) persiapan biji karabenguk (*Mucuna pruriens L*); (2) ekstraksi biji karabenguk; (3) sintesis biokomposit Gelatin-Glutaraldehid *Mucuna pruriens L* (G-GMP); (4) Karakterisasi biokomposit G-GMP dengan menggunakan alat instrumen seperti *Fourier Transform Infrared* (FTIR); dan Uji Katalepsi terhadap mencit. Bagan alir penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada gambar 3.1.

3.3.1 Persiapan Biji Karabenguk (*Mucuna pruriens L*)

Biji karabenguk yang sudah dipanen kemudian direndam selama 1-2 hari dengan mengganti air setiap 4-6 jam sekali. Proses perendaman ini bertujuan mengurangi kandungan HCN dalam biji karabenguk yang bersifat karsinogenik. Biji karabenguk yang sudah menggembung dikupas sehingga kulit dengan daging bijinya terpisah. Daging biji karabenguk dikeringkan dibawah sinar matahari selama 30 menit-1 jam dan sisanya dibiarkan didalam ruangan. Setelah daging biji karabenguk kering, kemudian digiling hingga menjadi serbuk karabenguk.

3.3.2 Pembuatan Ekstrak Biji Karabenguk (*Mucuna pruriens L*)

Serbuk biji karabnguk diekstraksi menggunakan pelarut etanol-air dengan perbandingan volume 1:1 dan ditambahkan asam sitrat hingga pH 3. Teknik ekstraksi yang dilakukan adalah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Serbuk biji karabenguk direndam selama 3x24 jam dengan penggantian

Ari Nur Fitrianti, 2018

**AKTIVITAS ANTIPARKINSON BOKOMPOSIT GELATIN-
GLUTARALDEHID EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens L*) PADA MENCIT**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

pelarut setelah 24 jam. Maserat hasil ekstraksi diuapkan sampai kering pada suhu 40°C dibawah tekanan rendah dalam *rotary vacuum evaporator*. Diperoleh ekstrak karabenguk yang lebih pekat dan dikeringkan menggunakan *freeze dryer*. Hasil dari *freeze dryer* berupa padatan hitam dan disimpan dalam desikator karena bersifat higroskopis.

3.3.3 Sintesis Biokomposit Gelatin-*Mucuna pruriens* L (G-GMP)

Larutan ekstrak biji karabenguk 20.000 ppm dipreparasi dengan menimbang 2 gram ekstrak biji karabenguk dan dilarutkan dengan 100 ml air *demineralisasi*, kemudian dilakukan pengadukan dengan shaker selama ± 24 jam pada suhu 25°C dan 100 rpm. Larutan gelatin dipreparasi dengan menimbang 200 mg gelatin yang dilarutkan dengan 10 ml akuades dan dipanaskan pada suhu 40°C dengan pengadukan 300 rpm menggunakan *stirrer*, kemudian larutan dimasukkan kedalam corong pisah dan ditambahkan 10 ml aseton. Terbentuk dua lapisan (atas dan bawah) yang dipisahkan dan bagian bawah yang diambil ditambahkan 10 ml akuades diaduk selama 30 menit pada 300 rpm menggunakan *stirrer*.

Hasil pengadukan ditambahkan HCl 0,1M hingga larutan gelatin memiliki pH 4,5. Kemudian ditambahkan 10 ml larutan ekstrak biji karabenguk 20.000ppm tetes demi tetes, sehingga larutan berwarna kuning seulas berubah secara perlahan menjadi berwarna coklat kehitaman. Ditambahkan 30ml aseton tetes demi tetes hingga larutan kuning kecoklatan dan terdapat endapan hitam, serta ditambahkan 100µL glutaraldehid sebagai agen pembentuk *cross-linker*. Campuran tersebut dipanaskan pada suhu 40°C selama 30menit dengan pengadukan 300 rpm menggunakan *stirrer* dan ditambahkan 1 ml larutan tween-80. Setelah biokomposit terbentuk, dilakukan pemisahan dengan cara sentrifugasi pada 4000 rpm selama 2 kali 30 menit untuk memisahkan supernata dan residu pada biokomposit G-GMP. Padatan yang terbentuk dikeringkan pada suhu ruang.

Ari Nur Fitrianti, 2018

**AKTIVITAS ANTIPARKINSON BIOKOMPOSIT GELATIN-
GLUTARALDEHID EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens*
L) PADA MENCIT**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

1.4 Karakterisasi Biokomposit Gelatin-Glutaraldehyd *Mucuna pruriens L* (G-GMP)

3.3.4 Karakterisasi Biokomposit Gelatin-Glutaraldehyd *Mucuna pruriens L* (G-GMP) dengan Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR)

Karakterisasi yang dilakukan dengan menggunakan spektroskopi FTIR ini bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi senyawa yang terkandung dalam ekstrak *Mucuna pruriens L* dan biokomposit G-GMP. Dalam penentuan gugus-gugus fungsi ini dilakukan dengan menggunakan spektroskopi FTIR Prestige 21 Shimadzu pada *range* 4000-400 cm^{-1} .

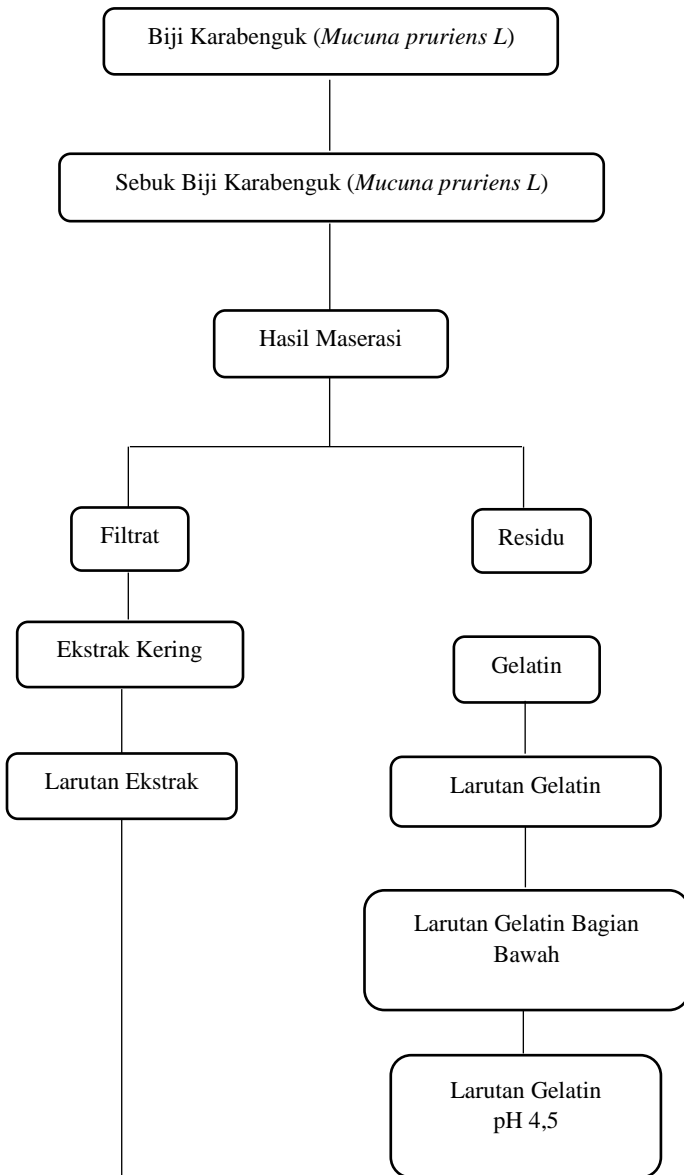
3.3.2 Karakterisasi biokomposit Gelatin-Glutaraldehyd *Mucuna pruriens L* (G-GMP) dengan Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray (SEM-EDX)

Karakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan untuk mengetahui bentuk dan ukuran biokomposit G-GMP yang terbentuk. Detektor yang digunakan adalah *energy Dispersive X-Ray* (EDX), sehingga dapat mengetahui unsur yang terdapat pada biokomposit G-GMP.

Ari Nur Fitrianti, 2018

**AKTIVITAS ANTIPARKINSON BOKOMPOSIT GELATIN-
GLUTARALDEHID EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens L*) PADA MENCIT**

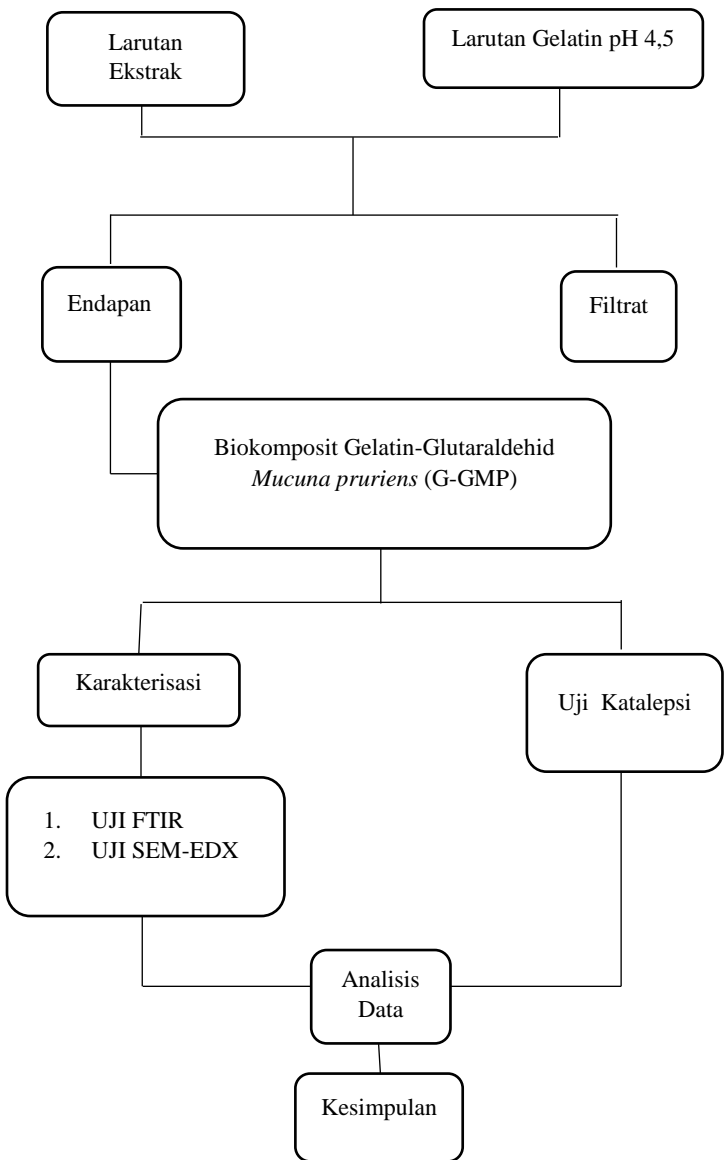
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu



Ari Nur Fitrianti, 2018

**AKTIVITAS ANTIPARKINSON BIOKOMPOSIT GELATIN-
GLUTARALDEHID EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens*
L) PADA MENCIT**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian



Ari Nur Fitrianti, 2018

**AKTIVITAS ANTIPARKINSON BIOKOMPOSIT GELATIN-
GLUTARALDEHID EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens*
L) PADA MENCIT**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

3.3.5 Uji Katalepsi

3.3.5.1 Preparasi Hewan Uji

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan berusia tiga bulan dengan berat badan 18-35 gram. Mencit dijaga dalam kondisi standar 22°C, dalam kandang. Mencit diberi pakan PC 551. Mencit didistribusikan secara acak menjadi sembilan kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari tiga ekor mencit untuk pengujian katalepsi.

3.3.5.2 Preparasi Pembuatan Dosis

Pada uji katalepsi, dosis ekstrak biji karabenguk yang digunakan adalah dosis 200 mg/kg berat badan. Sedangkan dosis G-GMP yang digunakan adalah dosis 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg dan 25 mg/kg berat badan.

1. Pembuatan sediaan PGA 1%
PGA ditimbang sebanyak 1 gram dan dicampur menggunakan mortar sambil ditambahkan air hangat sedikit demi sedikit. Setelah itu dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, kemudian ditambahkan air sampai tanda batas dan dihomogenkan.
2. Pembuatan sediaan Haloperidol dosis 5 mg/kg berat badan
Haloperidol ditimbang sebanyak 6,5 mg, digerus dan dicampur menggunakan mortar sambil ditambahkan 25 ml larutan PGA 1%, kemudian ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
3. Pembuatan sediaan L-DOPA dosis 10 mg/kg berat badan
L-DOPA ditimbang sebanyak 4 mg, digerus dan dicampur menggunakan mortar sambil ditambahkan 10 ml larutan PGA 1%, kemudian ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
4. Pembuatan sediaan ekstrak biji karabenguk dosis 200 mg/kg berat badan
Ekstrak biji karabenguk ditimbang sebanyak 80 mg, digerus dan dicampur menggunakan mortar sambil ditambahkan 10

Ari Nur Fitrianti, 2018

**AKTIVITAS ANTIPARKINSON BIOKOMPOSIT GELATIN-
GLUTARALDEHID EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens*
L) PADA MENCIT**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

- ml larutan PGA 1%, kemudian ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
5. Pembuatan sediaan biokomposit G-GMP dosis 5 mg/kg berat badan
Padatan biokomposit G-GMP ditimbang sebanyak 2 mg, digerus dan dicampur menggunakan mortar sambil ditambahkan 10 ml larutan PGA 1%, kemudian ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 6. Pembuatan sediaan biokomposit G-GMP dosis 10 mg/kg berat badan
Padatan biokomposit G-GMP ditimbang sebanyak 4 mg, digerus dan dicampur menggunakan mortar sambil ditambahkan 10 ml larutan PGA 1%, kemudian ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 7. Pembuatan sediaan biokomposit G-GMP dosis 15 mg/kg berat badan
Padatan biokomposit G-GMP ditimbang sebanyak 6 mg, digerus dan dicampur menggunakan mortar sambil ditambahkan 10 ml larutan PGA 1%, kemudian ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 8. Pembuatan sediaan biokomposit G-GMP dosis 20 mg/kg berat badan
Padatan biokomposit G-GMP ditimbang sebanyak 8 mg, digerus dan dicampur menggunakan mortar sambil ditambahkan 10 ml larutan PGA 1%, kemudian ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.
 9. Pembuatan sediaan biokomposit G-GMP dosis 25 mg/kg berat badan
Padatan biokomposit G-GMP ditimbang sebanyak 10 mg, digerus dan dicampur menggunakan mortar sambil ditambahkan 10 ml larutan PGA 1%, kemudian ditambahkan larutan PGA 1% sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3.3.5.3 Tahap Pengujian

Hewan uji dibagi menjadi sembilan kelompok utama yaitu kelompok uji 1 (kontrol normal atau mencit sehat); kelompok uji 2 (kontrol negatif atau mencit yang diberi

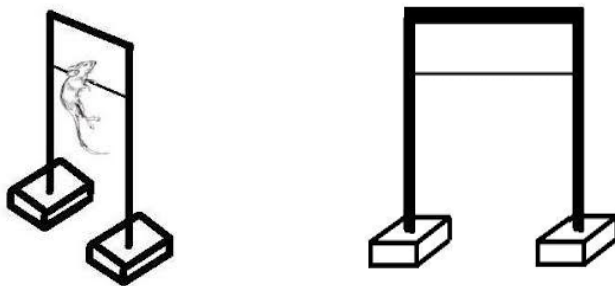
Ari Nur Fitrianti, 2018

**AKTIVITAS ANTIPARKINSON BIOKOMPOSIT GELATIN-
GLUTARALDEHID EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens*
L) PADA MENCIT**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

haloperidol 5 mg/kg bb); kelompok uji 3 (kontrol positif atau mencit yang diberi L-DOPA 10 mg/kg bb); kelompok uji 4 (mencit yang diberi ekstrak biji karabenguk dosis 200 mg/kg bb); kelompok uji 5 (G-GMP dosis 5 mg/kg bb); kelompok uji 6 (G-GMP dosis 10 mg/kg bb); kelompok uji 7 (G-GMP dosis 15 mg/kg bb); kelompok uji 8 (G-GMP dosis 20 mg/kg bb); dan kelompok uji 9 (G-GMP dosis 25 mg/kg bb).

Intensitas gejala katalepsi diukur sebagai lamanya waktu mencit menggantung dengan kedua kaki depan memegang kawat berdiameter 0,5 cm dengan tinggi 15 cm tanpa melakukan pergerakan. Pengamatan katalepsi dilakukan setelah 30 menit pemberian suspensi haloperidol. Haloperidol diberikan secara *intramuscular* 30 menit setelah pemberian suspensi pembawa (PGA 1%) atau G-GMP dosis 5mg/kg bb, 10mg/kg bb, 15mg/kg bb, 20mg/kg bb, 25mg/kg bb, ekstrak biji karabenguk dosis 200mg/kg bb dan L-DOPA dosis 10mg/kg bb yang diberikan secara oral (Costall, Naylor, & Olley, 1972). Volume sediaan dosis yang diberikan disesuaikan dengan berat badan setiap mencit. Skema pengujian katalepsi ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Skema Uji Katalepsi

(Sumber: Ardianti, 2012)

3.3.5.4 Analisis Data

Data hasil uji katalepsi pada mencit diolah secara statistik menggunakan *one way ANOVA* dilanjutkan dengan uji Dunnet. Data tersebut dianalisis dengan menggunakan *software SPSS 25*.

Ari Nur Fitrianti, 2018

**AKTIVITAS ANTIPARKINSON BIOKOMPOSIT GELATIN-
GLUTARALDEHID EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens*
L) PADA MENCIT**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu

Tujuan dari pengujian ini untuk melihat signifikansi dari data pengujian katalepsi (Ardianti, 2012).

Ari Nur Fitrianti, 2018

**AKTIVITAS ANTIPARKINSON BIOKOMPOSIT GELATIN-
GLUTARALDEHID EKSTRAK BIJI KARABENGUK (*Mucuna pruriens*
L) PADA MENCIT**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu |
perpustakaan.upi.edu